

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-342196

(43)Date of publication of application : 03.12.2003

(51)Int.Cl.

A61K 47/34
 A61K 9/14
 A61K 31/5575
 A61K 31/573
 A61K 47/24
 A61K 47/26
 A61P 9/14
 A61P 43/00

(21)Application number : 2002-159190

(71)Applicant : MUKKU:KK

(22)Date of filing : 31.05.2002

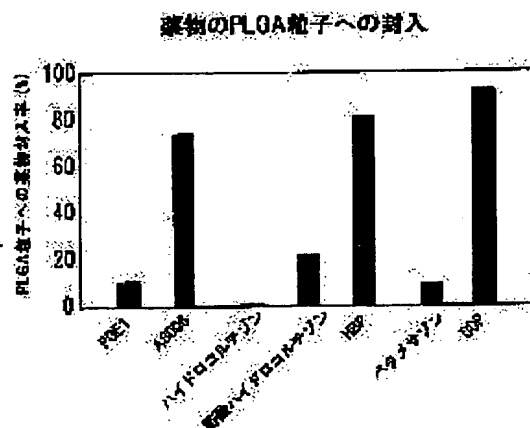
(72)Inventor : ISHIHARA TSUTOMU
 MIZUSHIMA YUTAKA

(54) COMPOSITION FOR INTRAVENOUS INJECTION, METHOD OF PRODUCTION FOR THE SAME AND ITS PREPARATION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a composition for intravenous injection gradually decomposed in replace of fine particles of fat, imparting a sufficient sustained release effect, excellent in inclusion ratio of a lipid soluble medicine and having the sustained release effect on the lesion region and to provide a method of production for the same and its preparation.

SOLUTION: The composition for intravenous injection is obtained by encapsulating a prostanoid or a steroid into fine particles of a polylactic acid-glycolic acid copolymer or polylactic acid and then absorbing lecithin or an analogous surfactant on the fine particles of the polylactic acid-glycolic acid copolymer or the polylactic acid. The method of production for the same dissolves an ester of the prostanoid or a steroid ester and the polylactic acid-glycolic acid copolymer or polylactic acid in an organic solvent such as dichloromethane or dimethyl sulfoxide and then emulsifying by using the lecithin or the analogous surfactant which imparts particles with 50-500 nm of diameter by using a ultrasonic generator or a Polytron agitator(R).



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

07.04.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

* NOTICES *

JPO and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The constituent for intravenous injections characterized by consisting of having enclosed prostanoids or a steroid with the polylactic acid-glycolic-acid copolymer or the polylactic acid particle, and having made lecithin or a similar surfactant stick to the front face of the polylactic acid-glycolic-acid copolymer concerned or a polylactic acid particle.

[Claim 2] Said polylactic acid-glycolic-acid copolymer, the constituent for intravenous injections according to claim 1 characterized by the diameter of a polylactic acid particle being 50-500nm.

[Claim 3] The constituent for intravenous injections according to claim 1 characterized by being the prostanoid acid ester mold prodrug which said prostanoids is easy to be enclosed with a polylactic acid-glycolic-acid copolymer or polylactic acid, is chemically stable, and is moreover easily changed into prostanoid acid in the living body.

[Claim 4] The constituent for intravenous injections according to claim 1 or 3 with which said prostanoid acid ester mold prodrug is characterized by introducing an acyl group at alkyl ester and the 9th place at the 1st place of prostaglandin E 1.

[Claim 5] The constituent for intravenous injections according to claim 1 with which said steroid is characterized by being steroid ester.

[Claim 6] The constituent for intravenous injections according to claim 1 or 5 with which said steroid ester is characterized by introducing acyl ester into the 17th place of betamethasone or a similar steroid, and the 21st place.

[Claim 7] The manufacturing method of the constituent for intravenous injections characterized by emulsifying underwater using the lecithin or the similar surfactant which can dissolve esterification prostanoid acid or an esterification steroid, a polylactic acid-glycolic-acid copolymer, or polylactic acid in the organic solvent represented with dichloromethane or dimethyl sulfoxide, and can be made into said diameter of 50-500nm.

[Claim 8] The manufacturing method of the constituent for intravenous injections characterized by adding the micell of lecithin or a similar surface active agent into the water suspension of a constituent, and making lecithin or a similar surface active agent stick to the front face of a polylactic acid-glycolic-acid copolymer or a polylactic acid particle again after removing from a constituent the lecithin or the similar surface active agent of a constituent manufactured according to said manufacturing method according to claim 7.

[Claim 9] Pharmaceutical preparation for intravenous injections characterized by consisting of the stabilizer and isotonicity agent which are added since it re-suspends and administration is possible after carrying out freeze-drying processing of said constituent for intravenous injections.

[Claim 10] Pharmaceutical preparation for intravenous injections according to claim 9 characterized by said stabilizer being trehalose or a sucrose.

[Claim 11] The constituent for intravenous injections according to claim 1 characterized by consisting of having enclosed with the polylactic acid-glycolic-acid copolymer or the polylactic acid particle the drug which can be released gradually by intracellular [, such as a macrophage with phagocytosis,], with bioactive held.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPJ are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the constituent for intravenous injections aiming at targeting and drug gradual release, manufacturing method, and its pharmaceutical preparation to a lesion part in detail about the constituent for intravenous injections, manufacturing method, and its pharmaceutical preparation.

[0002]

[Description of the Prior Art] Conventionally, as prostaglandin E 1 (PGE1) and a blood vessel wall target agent (RIPO PGE1) of similar prostanoids, one artificer etc. develops what enclosed PGE1 or its ester into the fat particle which is the diameter of 200nm, and the part is marketed and is used widely in some countries.

[0003] It excelled in stability and the rate of enclosure, and only the comparison became the 1st generation and, as for RIPO PGE1 of the second generation which enclosed PGE1 ester, effectiveness increased it.

[0004] Moreover, PGE1, PGI2, etc. are enclosed also with a patent of a researcher besides the former as one of much drugs at a polylactic acid-glycolic-acid copolymer (PLGA) or a polylactic acid particle (PLA), and the patent which applied it to the drug delivery system (DDS) is submitted.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, since a carrier was easily decomposability, after the target of said RIPO PGE1 was carried out to the blood vessel wall, it was decomposed immediately, the chief remedy separated and it had the trouble that sufficient gradual release effectiveness was not acquired.

[0006] Moreover, said PGE1, PGI2, etc. were enclosed and PGE1 and PGI2 themselves had the trouble of not being enclosed with a PLGA particle, in the technique which applied it to DDS.

[0007] Although this invention persons also take into consideration the rate of enclosure and the pharmacokinetics and metabolism in the living body of a particle, and it studies what kind of ester object of prostanoids, such as PGE1, is most suitable and the front face is covered with lecithin by the 200nm particle in invention before us Also examine particle size and a surfactant, and study establishing the creating method and it is also similarly set in a steroid. It examined what kind of ester object is suitable, and considered offering the prostanoids PLGA/PLA pharmaceutical preparation of sustained-release target pharmaceutical preparation or steroid PLGA/PLA pharmaceutical preparation which was most excellent with them.

[0008] Then, this invention aims at offering the constituent for intravenous injections which it is gradually decomposed instead of, and sufficient gradual release effectiveness is acquired, and is excellent in the rate of enclosure like second generation RIPO PGE1, and has the gradual release effectiveness by the lesion part, manufacturing method, and its pharmaceutical preparation. [a fat particle]

[0009]

[Means for Solving the Problem] In order to attain said purpose, the constituent for intravenous injections of this invention encloses prostanoids or a steroid with PLGA or a PLA particle, and

consists of having made lecithin or a similar surfactant stick to the front face of the PLGA concerned or a PLA particle. Moreover, that the diameter of the particle of PLGA and PLA is 50-500nm is the suitable range which is easy to be incorporated to a lesion part. It is because it is too small and it enters in addition to a lesion part, and it will be too large and 50nm or less will not go into a lesion part, if it is 500-1,000nm or more.

[0010] Said prostanoids is easy to be enclosed with PLGA or a PLA particle, and is chemically stable, and it is suitable that it is the prostanoid acid ester mold prodrug moreover easily changed into prostanoid acid in the living body.

[0011] It is suitable that said prostanoid acid ester mold prodrug introduces an acyl group (C 2-5) at alkyl ester (C 1-10) and the 9th place at the 1st place of PGE1.

[0012] It is suitable that said steroid is steroid ester.

[0013] It is suitable that said steroid ester introduces acyl ester (C 2-10) into the 17th place of betamethasone or a similar steroid and the 21st place.

[0014] Moreover, the manufacturing method of the constituent for intravenous injections of this invention is being underwater and emulsifying with an ultrasonic generator or the poly TRON agitator using the lecithin or the similar surfactants (Pluronic etc.) which can dissolve esterification prostanoid acid or an esterification steroid, PLGA, or a PLA particle in the organic solvent of being represented with dichloromethane or dimethyl sulfoxide (DMSO) etc., and can be made into said diameter of 50-500nm.

[0015] Furthermore, after removing from a constituent the lecithin or the similar surface active agent (it is the **** when many chief remedies are contained in these) of a constituent manufactured according to the aforementioned manufacturing method, it is adding the micell of lecithin or a similar surface active agent into the water suspension of the constituent concerned, and making lecithin or a similar surface active agent stick to the front face of PLGA or a PLA particle again with an ultrasonic generator or the poly TRON agitator.

[0016] Moreover, the pharmaceutical preparation for intravenous injections of this invention consists of the stabilizer and isotonicity agent which are added since it re-suspends and administration is possible after carrying out freeze-drying processing of said constituent for intravenous injections.

[0017] In addition, further, the constituents for intravenous injections of this invention are intracellular [, such as a macrophage with phagocytosis,], and consist of having enclosed with PLGA or a PLA particle the drug which can be released gradually, with bioactive held.

[0018] It is important to control a rate of enclosure, emission behavior, etc. of surface physical properties, particle size, and a drug of a particle, in order to use this particle as pharmaceutical preparation although it consists of the constituent for intravenous injections of this invention, prostanoid acid ester which in other words was enclosed with the PLGA/PLA particle by which drug enclosure pharmaceutical preparation was covered with surfactants, such as lecithin, as mentioned above, and the particle concerned, or steroid ester.

[0019] Surface physical properties are controllable by using a similar surfactant in addition to lecithin. Moreover, since a surface active agent affects an emulsification condition, the weight ratio of the lecithin at the time of preparation and a PLGA/PLA particle can be changed, or the particle size of pharmaceutical preparation can be controlled by changing the reinforcement of emulsification equipments, such as an ultrasonic generator, etc. Which grain size is incorporated to various lesion parts (reticuloendothelial system which participates in a morbid blood vessel wall and inflammation part, a cancer organization, and formation of the pathosis) differ, respectively.

[0020] In order to raise the rate of enclosure to the pharmaceutical preparation of a drug, it becomes possible by raising the lipophilicity according to esterification of a drug. Moreover, it is necessary to optimize the die length of the alkyl to introduce or an acyl chain in that case. Furthermore, control of the gradual release rate of a drug can be performed by using PLGA and the PLA particle of different molecular weight. In order to evaluate developed pharmaceutical preparation, it is necessary to build in vitro or the animal (in vivo) model suitable for examination of PK/PD (pharmacokinetics and metabolism and pharmacological action).

[0021] As mentioned above, sufficient gradual release effectiveness is acquired using the

PLGA/PLA particle into which this invention is gradually decomposed instead of a fat particle. Moreover, it excels in the rate of enclosure like second generation RIPO PGE1 by using the esterified steroid, and the pharmaceutical preparation which has both the outstanding target effectiveness and gradual release effectiveness with pharmaceutical preparation with the gradual release effectiveness, i.e., said presentation, by the lesion part is prepared.

[0022]

[Example] The example of this invention is described below.

(Example 1) The PLGA/PLA pharmaceutical preparation creating method PLGA (Wako) or PLA (Wako) 100mg, yolk lecithin (Wako) 10mg, and a drug (0.5mg) were dissolved into 1ml dichloromethane, and it was slowly dropped through the needle of 27G into 25ml distilled water stirred with PolytronPT-2100 (Kinematica) or an ultrasonic generator (TOMY), cooling by the ice bath. After continuing stirring for 10 minutes then, stirring was continued at the room temperature with the stirrer for 2 hours, and dichloromethane was distilled off. The obtained particle was condensed by ultrafiltration (Amicon, centrprepYM-10), and the gel filtration (Pharmacia, PD-10) refined it. Centrifugal [of the obtained particle] was carried out by 13000g for 10 minutes, and the quantum of the drug contained during supernatant liquid and precipitate was carried out by HPLC. HPLC was analyzed by the system which measures absorption (210nm or 240nm) using C4 opposition column (Waters, Symmentry300) by water / acetonitrile system. As a drug, hydro cortisone, acetic-acid hydro cortisone, and butanoic acid propionic-acid hydro cortisone (HBP) betamethasone dipropionic acid betamethasone (BDP) were used as prostanoids as AS006 which esterified PGE1, and its carboxylic acid and hydroxyl group, and a steroid. As the result was shown in drawing 1, in AS006 which is an ester object, the rate of enclosure became high notably to the ability to have not made PGE1 almost enclose. Moreover, in HBP and BDP which are the ester object, the rate of enclosure became high notably to the ability to have not made most of hydro cortisone and BESAMESAZON enclose.

[0023] (Example 2) PLGA (Wako) or PLA(Wako) 30mg, yolk lecithin (Wako) 3mg and AS006, or BDP (1mg) was dissolved into 1ml dichloromethane, and the particle was prepared by the same approach as an example 1. The obtained particle was suspended during distilled water, PBS, or the 3%BSA content PBS, centrifugal was carried out by 13000g after predetermined time for 10 minutes, and the quantum of AS006 contained during precipitate or the BDP was carried out by HPLC. As the result was **2**(ed), in 37-degree C water or PBS, in PBS which AS006 was gradually emitted over 11 days, and contained 3%BSA which is 37 degrees C, AS006 was emitted over four days and it became clear that prostanoids is released gradually from a particle. Although about 30% was emitted at once in early stages also in PBS which emission of AS006 was hardly checked also after ten days, and contained 3%BSA which is 4 degrees C when it incubated by underwater [4-degree C], very loose emission behavior was shown after that. Therefore, it became clear that this particle is pharmaceutical preparation stable in 4-degree C water suspension. Furthermore, as shown in drawing 3, it became clear to take the gradual release behavior as AS006 also with BDP same in the 37-degree C 3%BSA content PBS.

[0024] (Example 3) After suspending the pharmaceutical preparation prepared in the example 1 in FBS (fetal calf serum) or 1%SDS water solution 80% and incubating at 37 degrees C for 5 minutes, centrifugal was carried out by 13,000g for 10 minutes, and the quantum of the amount of drugs contained during precipitate was carried out by HPLC. As a result was shown in drawing 4, under existence of 1%SDS or in 80%FBS, only about 10 - 20% of AS006 remained. AS006 is received. Even if it changed preparation conditions, such as raising the weight ratio of PLGA, in AS006 since the rate of this distribution did not change, it became clear that the compatibility to a lecithin layer is higher than a PLGA layer. Moreover, it turned out that the survival rate decreases on the concentration dependence target of BSA. It became clear that 80% or more remains in PLGA, and the drug is distributed in PLGA also by addition of SDS on the other hand in BDP and other drugs which are steroid derivatives.

[0025] (Example 4) The AS006 enclosure PLGA particle prepared in the example 2 was suspended in 1%SDS, and it washed centrifugally by 5000g after incubation at 37 degrees C for 5 minutes for 10 minutes. The obtained particle was re-distributed, carrying out ultrasonic irradiation in lecithin suspension, and the surface potential value of a particle was measured after

that. In the result, since it changed to negative a lot with -57.2mV after SDS addition to the surface potential value of the pharmaceutical preparation prepared in the example 2 having been -6.6mV , it became clear that lecithin carried out desorption from the front face. Moreover, as the example 3 showed at that time, both surface AS006 is also isolated from the particle. Furthermore, the surface potential value turned into the almost same value as -6.3mV and the value before SDS addition by ultrasonication in lecithin suspension after centrifugal washing of a particle. Therefore, it became clear that the PLGA particle with AS006 which the front face was covered with lecithin and enclosed with the interior of PLGA has been prepared.

[0026] (Example 5) 10% of stabilizing agent was added in the suspension of the PLGA particle prepared according to the example 2, and an acetone/dry ice performed freeze-drying processing after freezing. With the spectrophotometer, the turbidity of the suspension when re-distributing the dry PLGA particle with water was measured, and particle size was measured with the dynamic-light-scattering plan. Moreover, freeze-drying processing of the BDP content PLGA particle prepared according to the AS006 content PLGA particle and example 2 which were prepared according to the example 4 was carried out in 10% sucrose, and the amount of drug survival and emission behavior were measured according to the example 2. As shown in drawing 5, by the PLGA particle which freeze-dried only water by (he has no additive), the turbidity fall by floc formation was accepted and, as for the result, redispersible was remarkably low.

Moreover, significant condensation was accepted even when a mannitol and PEG were added as a stabilizer. However, in trehalose and a sucrose, the turbidity of almost same extent as freeze-drying processing before was maintained. By the PLGA particle which added the trehalose sucrose to the mean particle diameter (weighted mean value) of the particle which has not carried out freeze-drying processing having been 319nm as a result of measuring such particle size according to light scattering, 381nm was understood that the particle with redispersible [high] was obtained, respectively, although 398nm was obtained and there was some condensation. Furthermore, as shown in drawing 6 and drawing 7, as a result of measuring AS006 of a under [the 3%BSA content PBS], or the emission behavior of BDP, it was not concerned with the existence of freeze-drying processing, but the same emission behavior is taken, and it became clear that there is no effect on the gradual release by freeze drying.

[0027] (Example 6) The macrophage was extracted from the abdominal cavity of the mouse which proteose peptone was injected intraperitoneally 1.5ml 10%, and was stimulated, seeding was carried out by $100,000\text{cells}/48\text{well}$, and it cultivated by RPMI1640 culture medium (it contains FBS10%) on several. the PLGA particle which enclosed the rhodamine of the fluorochrome prepared after culture-medium exchange according to the example 1 as a drug model — adding — 1 hour and a half — it incubated at 37 degrees C . It washed 3 times by PBS, the after [predetermined time of] cell was fixed with the neutral formalin solution 4%, and the cell was observed with the fluorescence microscope (IX-70, Olympus). As for it, the result turned out that it is notably incorporated by the macrophage by enclosing with a particle compared with the case where only a rhodamine is added, as shown in drawing 8. Moreover, after incorporation of a particle, as a result of performing culture-medium exchange and incubating at 37 degrees C , it became clear that the rhodamine of a considerable amount is continuing remaining in intracellular after one week. Moreover, the PLA particle was used instead of the PLGA particle, same examination was performed, and the same result was obtained.

[0028] (Example 7) The ridge section of a rat was injected with 100micro of $6\text{mg}/[\text{ml}]$ desiccation M.Butyricum content AJU band suspension I, and it considered as the durability arthritis model rat at the vola of a six days after left leg by doing 100microl administration of a carrageenin content physiological saline 1% (Y. Mizushima et.al., J.Pharm.Pharmac., 1972, 24, 781-785). The BDP content PLGA pharmaceutical preparation (50microg / rat as betamethasone) prepared in the example 2 was prescribed for the patient from the caudal vein 24 hours after carrageenin administration, and the swelling of a guide peg was measured with time in volume meter. As contrast, the rat which carried out caudal vein administration only of PBS, and the rat which administered the phosphoric-acid betamethasone of this potency hypodermically were used. Although the result had controlled the swelling strongly [on the 1st] when phosphoric-acid betamethasone was prescribed for the patient as shown in drawing 9,

depressor effect became weak rapidly after that. On the other hand, by BDP content PLGA pharmaceutical preparation, depressor effect comparable as phosphoric-acid betamethasone was shown on the 1st, and it became clear that a swelling can be strongly controlled over several days after that.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is drawing showing the rate of enclosure of various drugs to the PLGA particle prepared according to the example 1.

[Drawing 2] It is drawing showing the emission behavior of AS006 from the AS006 enclosure PLGA particle prepared according to the example 2.

[Drawing 3] It is drawing showing the emission behavior of BDP from the BDP enclosure PLGA particle prepared according to the example 2.

[Drawing 4] It is drawing having shown the survival rate to the PLGA particle of the drug after carrying out suspension neglect of each drug enclosure PLGA particle prepared according to the example 1 for 5 minutes at 37 degrees C into 1%SDS water solution or 80%FBS.

[Drawing 5] It is drawing having shown the turbidity of the PLGA particle when re-suspending with water the PLGA particle prepared according to the example 2 after freeze drying under each stabilizer existence.

[Drawing 6] It is drawing having shown the emission behavior of AS006 when freeze-drying in 10% sucrose and re-suspending the PLGA particle which removed AS006 of the surface prepared according to the example 4 in the 3%BSA content PBS.

[Drawing 7] It is drawing having shown the emission behavior of BDP when freeze-drying in 10% sucrose and re-suspending the BDP enclosure PLGA particle prepared according to the example 2 in the 3%BSA content PBS.

[Drawing 8] It is drawing which observed incorporation of the macrophage cell of the rhodamine enclosure PLGA particle prepared according to the example 1, and its incorporated cell residual property of a rhodamine with the fluorescence microscope with time.

[Drawing 9] It is drawing having shown the inflammation depressor effect to the arthritis model rat of the BDP content PLGA particle prepared according to the example 2.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-342196

(P2003-342196A)

(43) 公開日 平成15年12月3日 (2003.12.3)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
A 6 1 K 47/34		A 6 1 K 47/34	4 C 0 7 6
9/14		9/14	4 C 0 8 6
31/5575		31/5575	
31/573		31/573	
47/24		47/24	
審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 7 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-159190(P2002-159190)

(22) 出願日 平成14年5月31日 (2002.5.31)

(71) 出願人 391043055

株式会社ムック

東京都港区愛宕二丁目5番1号

(72) 発明者 石原 務

東京都大田区中央5-24-14-101

(72) 発明者 水島 裕

東京都世田谷区梅丘1-1-11

(74) 代理人 100096758

弁理士 高橋 剛 (外1名)

最終頁に続く

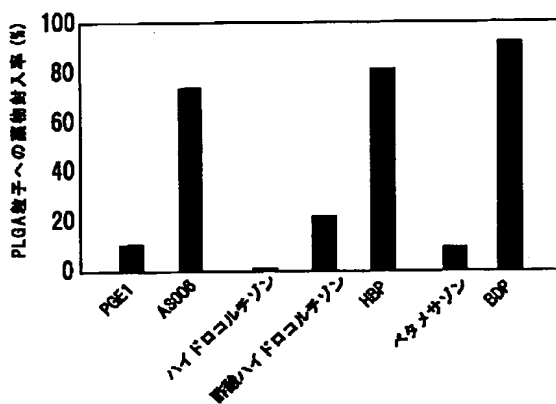
(54) 【発明の名称】 静脈注射用組成物、その製造法およびその製剤

(57) 【要約】

【課題】 脂肪微粒子の代わりに徐々に分解され、十分な徐放効果が得られ、また、脂溶性薬物の封入率に優れ、病変部位で徐放効果を有する静脈注射用組成物、その製造法およびその製剤を提供すること。

【解決手段】 静脈注射用組成物は、プロスタノイドあるいはステロイドを、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体またはポリ乳酸微粒子に封入し、レシチンあるいは類似界面活性剤を当該ポリ乳酸-グリコール酸共重合体またはポリ乳酸微粒子の表面に吸着させたことからなる。その製造法は、エステル化プロスタノイドあるいはエステル化ステロイドとポリ乳酸-グリコール酸共重合体またはポリ乳酸をジクロロメタンあるいはジメチルスルホキシドなどの有機溶媒などに溶解し、50～500nmの直径にすることができるレシチンあるいは類似界面活性剤を用い、水中で、超音波発生器あるいはポリトロン攪拌機などにて乳化することである。

薬物のPLGA粒子への封入



【特許請求の範囲】

【請求項1】 プロスタノイドあるいはステロイドを、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体またはポリ乳酸微粒子に封入し、レシチンあるいは類似界面活性剤を当該ポリ乳酸-グリコール酸共重合体またはポリ乳酸微粒子の表面に吸着させたことからなることを特徴とする静脈注射用組成物。

【請求項2】 前記ポリ乳酸-グリコール酸共重合体、ポリ乳酸微粒子の直径が50～500nmであることを特徴とする請求項1記載の静脈注射用組成物。

【請求項3】 前記プロスタノイドが、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体またはポリ乳酸に封入されやすく、化学的に安定で、しかも生体内でプロスタノ酸に容易に変換されるプロスタノ酸エステル型プロドラッグであることを特徴とする請求項1記載の静脈注射用組成物。

【請求項4】 前記プロスタノ酸エステル型プロドラッグが、プロスタグランジンE1の1位にアルキルエステルと9位にアシル基を導入したものであることを特徴とする請求項1又は3記載の静脈注射用組成物。

【請求項5】 前記ステロイドが、ステロイドエステルであることを特徴とする請求項1記載の静脈注射用組成物。

【請求項6】 前記ステロイドエステルが、ベタメサゾンや類似ステロイドの17位及び21位にアシルエステルを導入したものであることを特徴とする請求項1又は5記載の静脈注射用組成物。

【請求項7】 エステル化プロスタノ酸あるいはエステル化ステロイドとポリ乳酸-グリコール酸共重合体またはポリ乳酸をジクロロメタンあるいはジメチルスルホキシドで代表される有機溶媒に溶解し、前記50～500nmの直径にすることができるレシチンあるいは類似界面活性剤を用い、水中で乳化することを特徴とする静脈注射用組成物の製造法。

【請求項8】 前記請求項7記載の製造法により製造した組成物のレシチンあるいは類似界面活性剤を組成物から除去した後、レシチンあるいは類似界面活性剤のミセルを組成物の水懸濁液に加え、再びレシチンあるいは類似界面活性剤をポリ乳酸-グリコール酸共重合体またはポリ乳酸微粒子の表面に吸着させることを特徴とする静脈注射用組成物の製造法。

【請求項9】 前記静脈注射用組成物を凍結乾燥処理した後再懸濁し投与ができるために加える安定剤及び等張剤からなることを特徴とする静脈注射用製剤。

【請求項10】 前記安定剤がトレハロースまたはスクロースであることを特徴とする請求項9記載の静脈注射用製剤。

【請求項11】 食食作用のあるマクロファージ等の細胞内で、生物活性を保持したまま徐放可能な薬物をポリ乳酸-グリコール酸共重合体またはポリ乳酸微粒子に封入したことからなることを特徴とする請求項1記載の静

脈注射用組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、静脈注射用組成物、その製造法およびその製剤に関し、詳しくは病変部位へのターゲティングと薬物徐放を目的とした静脈注射用組成物、その製造法およびその製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、プロスタグランジンE1(PGE1)及び類似のプロスタノイドの血管壁ターゲット剤(リボPGE1)としては、発明者の一人等が直径200nmの脂肪微粒子中にPGE1あるいはそのエステルを封入したものを開発し、その一部は市販され、いくつかの国で広く使用されている。

【0003】PGE1エステルを封入した第2世代のリボPGE1は安定性、封入率に優れ、効果は第1世代に比較しかなり増した。

【0004】又、これまで他の研究者の特許にもポリ乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)またはポリ乳酸微粒子(PLA)に、多数の薬剤のうちのひとつとしてPGE1、PGI2などを封入し、それをドラッグデリバリーシステム(DDS)に応用した特許が提出されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかし、前記リボPGE1はキャリアが易分解性であるため、血管壁にターゲットされた後すぐに分解され主薬が遊離してしまい十分な徐放効果が得られないという問題点があった。

【0006】又、前記PGE1、PGI2などを封入し、それをDDSに応用した技術においては、PGE1、PGI2そのものはPLGA微粒子に封入されないという問題点があった。

【0007】本発明者らは、粒子の封入率や生体内での薬物動態も考慮し、PGE1などのプロスタノイドのいかなるエステル体が最も適しているかを研究し、また、我々の以前の発明では200nmの微粒子で表面がレシチンで覆われているが、粒径や界面活性剤も検討し、その作成法を確立することを研究し、同様にステロイドにおいても、いかなるエステル体が適しているかを検討し、それらにより最も優れた徐放性ターゲット製剤のプロスタノイドPLGA/PLA製剤あるいはステロイドPLGA/PLA製剤を提供することを考えた。

【0008】そこで、本発明は、脂肪微粒子の代わりに徐々に分解され、十分な徐放効果が得られ、また、第2世代リボPGE1と同様に封入率に優れ、病変部位で徐放効果を有する静脈注射用組成物、その製造法およびその製剤を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】前記目的を達成するために本発明の静脈注射用組成物は、プロスタノイドあるいはステロイドをPLGAまたはPLA微粒子に封入し、レシチンあるいは類似界面活性剤を当該PLGAまたはPLA微粒子

の表面に吸着させたことからなる。又、PLGA、PLAの微粒子の直径が50~500nmであることが、病変部位に取り込まれやすい好適の範囲である。50nm以下は小さすぎて病変部位以外に入ってしまう、500~1,000nm以上だと大きすぎて病変部位に入らないからである。

【0010】前記プロスタノイドが、PLGAまたはPLA微粒子に封入されやすく、化学的に安定で、しかも生体内でプロスタン酸に容易に変換されるプロスタン酸エステル型プロドラッグであることが好適である。

【0011】前記プロスタン酸エステル型プロドラッグが、PGE1の1位にアルキルエステル(C1~10)と9位にアシル基(C2~5)を導入したものであることが好適である。

【0012】前記ステロイドが、ステロイドエステルであることが好適である。

【0013】前記ステロイドエステルが、ベタメサゾンや類似ステロイドの17位及び21位目にアシルエステル(C2~10)を導入したものであることが好適である。

【0014】又、本発明の静脈注射用組成物の製造法は、エステル化プロスタン酸あるいはエステル化ステロイドとPLGAまたはPLA微粒子をジクロロメタンあるいはジメチルスルホキシド(DMSO)で代表されるなどの有機溶媒などに溶解し、前記50~500nmの直径にすることができ、レシチンあるいは類似界面活性剤(ブルロニック等)を用い、水中で、超音波発生器あるいはポリトロン攪拌機などにて乳化することである。

【0015】さらに、前記の製造法により製造した組成物のレシチンあるいは類似界面活性剤(これらに主薬が多く含まれる場合あり)を組成物から除去した後、レシチンあるいは類似界面活性剤のミセルを当該組成物の水懸濁液に加え、超音波発生器あるいはポリトロン攪拌機などにて、再びレシチンあるいは類似界面活性剤をPLGAまたはPLA微粒子の表面に吸着させることである。

【0016】又、本発明の静脈注射用製剤は、前記静脈注射用組成物を凍結乾燥処理した後再懸濁し投与ができるために加える安定剤及び等張剤からなるものである。

【0017】なお、本発明の静脈注射用組成物は、さらに、食食作用のあるマクロファージ等の細胞内で、生物活性を保持したまま徐放可能な薬物をPLGAまたはPLA微粒子に封入したことからなるものである。

【0018】本発明の静脈注射用組成物、いいかえれば薬物封入製剤は、前記のようにレシチン等の界面活性剤に覆われたPLGA/PLA微粒子と当該微粒子に封入されたプロスタン酸エステルあるいはステロイドエステルからなるが、この微粒子を製剤として利用するためには、微粒子の表面物性・粒径・薬物の封入率及び放出挙動などを制御することが重要である。

【0019】表面物性は、レシチンに加え、類似の界面活性剤を利用することで制御可能である。また、界面活性剤は乳化状態に影響を及ぼすので、調製時のレシチン

とPLGA/PLA微粒子の重量比を変えたり、超音波発生器などの乳化装置の強度などを変えることで製剤の粒径を制御できる。各種病変部位(病的血管壁、炎症部位、癌組織、病的状態の形成に関与する細網内皮系)にどの粒径が取り込まれるかがそれぞれ異なる。

【0020】薬物の製剤への封入率を高めるには、薬物のエステル化によりその脂溶性を高めることで可能となる。また、その際、導入するアルキルやアシル鎖の長さを最適化する必要がある。更に、異なる分子量のPLGAやPLA微粒子を利用することで薬物の徐放速度の制御ができる。開発した製剤の評価を行なうためには、PK/PD(薬物動態や薬理作用)の検討に適したin vitroあるいは動物(in vivo)モデルを構築する必要がある。

【0021】前記のように、本発明は、脂肪微粒子の代わりに徐々に分解されるPLGA/PLA微粒子を用いたものであり、十分な徐放効果が得られるものである。また、エステル化したステロイドを利用することで、第2世代リポPGE1と同様に封入率に優れ、病変部位で徐放効果を有した製剤、即ち、前記組成により、すぐれたターゲット効果および徐放効果の両方を有する製剤が調製されるものである。

【0022】

【実施例】以下に本発明の実施例について記述する。

(実施例1) PLGA/PLA製剤作成法

PLGA(和光)あるいはPLA(和光)100mg、卵黄レシチン(和光)10mg及び薬物(0.5mg)を1mlジクロロメタン中に溶解し、氷浴により冷却しながらPolytronPT-2100(Kinematica)あるいは超音波発生器(TOMY)で攪拌した25mlの蒸留水中に、27Gの針を通してゆっくりと滴下した。そのまま攪拌を10分間続けた後、スターラーにて室温で2時間攪拌を続け、ジクロロメタンを留去した。得られた微粒子は、限外ろ過(アミコン、centriprepYM-10)で濃縮しゲルろ過(ファルマシア、PD-10)により精製した。得られた微粒子を13000gで10分遠心し、上清中及び沈殿中に含まれる薬物をHPLCにより定量した。HPLCは、水/アセトニトリル系でC4逆相カラム(Waters, Symmetry300)を用い210nmあるいは240nmの吸収を測定する系で解析した。薬物としては、プロスタノイドとして、PGE1及びそのカルボン酸と水酸基をエステル化したAS006、ステロイドとして、ハイドロコルチゾン・酢酸ハイドロコルチゾン・酪酸プロピオン酸ハイドロコルチゾン(HBP)・ベタメサゾン・ジプロピオン酸ベタメサゾン(BDP)を用いた。結果は図1に示したように、PGE1はほとんど封入させることができなかったのに対し、エステル体であるAS006においては、封入率が顕著に高くなった。また、ハイドロコルチゾンとベタメサゾンはほとんど封入させることができなかったのに対し、そのエステル体であるHBPとBDPにおいては、封入率が顕著に高くなった。

【0023】(実施例2) PLGA(和光)あるいはPLA(和光)30mg、卵黄レシチン(和光)3mg及びAS006あるいはBDP(1

mg)を1mlジクロロメタン中に溶解し、実施例1と同様の方法により微粒子を調製した。得られた微粒子を蒸留水、PBSあるいは3%BSA含有PBS中に懸濁し、所定時間後13000gで10分遠心し、沈殿中に含まれるAS006あるいはBDPをHPLCにより定量した。結果は図2示したように、37°Cの水あるいはPBS中では、11日にわたり徐々にAS006が放出され、また、37°Cの3%BSAを含んだPBS中では、4日にわたりAS006が放出され、プロスタノイドが微粒子から徐放されることが明らかになった。4°Cの水中でインキュベートした場合には、10日後でもほとんどAS006の放出が確認されず、また、4°Cの3%BSAを含んだPBS中でも、初期に30%程度が一度に放出されたが、その後は極めて緩やかな放出挙動を示した。よって、この微粒子は4°Cの水懸濁液中で安定な製剤であることが明らかになった。さらに、図3に示したように、BDPも37°Cの3%BSA含有PBS中で、AS006と同様の徐放挙動をとることが明らかになった。

【0024】(実施例3) 実施例1にて調製した製剤を80%FBS(ウシ胎児血清)あるいは1%SDS水溶液中に懸濁し、37°Cで5分インキュベートした後、13,000gで10分遠心し、沈殿中に含まれる薬物量をHPLCにより定量した。結果は図4に示すように、1%SDSの存在下あるいは80%FBS中では、10~20%程度のAS006しか残存していなかった。AS006に対するPLGAの重量比を高めるなど調製条件を変えてもこの分布の割合は変化しなかったことから、AS006においてはPLGA層よりレシチン層への親和性が高いことが明らかになった。また、BSAの濃度依存的にその残存率が減少することがわかった。一方、ステロイド誘導体であるBDPや他の薬物においては、SDSの添加によっても80%以上がPLGA内に残存しており、薬物がPLGA内に分布していることが明らかになった。

【0025】(実施例4) 実施例2にて調製したAS006封入PLGA微粒子を1%SDS中に懸濁し、5分間37°Cでインキュベート後5000gで10分遠心洗浄した。得られた微粒子をレシチン懸濁液中で超音波照射をしながら再分散させ、その後微粒子の表面電位値を測定した。結果は、実施例2で調製した製剤の表面電位値が-6.6mVであったのに対し、SDS添加後には-57.2mVと大きく負に変化したことから、レシチンが表面から脱着したことが明らかになった。また、その際実施例3で示したように表層のAS006も共に微粒子から遊離されている。さらに微粒子の遠心洗浄後、レシチン懸濁液中で超音波処理することで、表面電位値が-6.3mVとSDS添加前の値とほぼ同じ値になった。よって、レシチンにより表面を覆われ、かつ、PLGA内部に封入されたAS006を有したPLGA微粒子が調製できたことが明らかになった。

【0026】(実施例5) 実施例2に従い調製したPLGA微粒子の懸濁液中に10%の安定化剤を添加し、アセトン/ドライアイスで凍結後、凍結乾燥処理をおこなった。乾燥したPLGA微粒子を水で再分散した時の懸濁液の濁度を分

光光度計で、粒径を動的光散乱計で測定した。また、実施例4に従い調製したAS006含有PLGA微粒子及び実施例2に従い調製したBDP含有PLGA微粒子を10%スクロース中で凍結乾燥処理し、薬物残存量・放出挙動を実施例2に従い測定した。結果は図5に示したように、水のみ(添加剤なし)で凍結乾燥したPLGA微粒子では、凝集体形成による濁度低下が認められ再分散性が著しく低かった。また、マンニトールやPEGを安定剤として添加した場合でも、有意な凝集が認められた。しかし、トレハロース及びスクロースにおいてはほぼ凍結乾燥処理前と同じ程度の濁度が維持されていた。これらの粒径を光散乱により測定した結果、凍結乾燥処理をしていない微粒子の平均粒径(重量平均値)が319nmであったのに対し、トレハロース・スクロースを添加したPLGA微粒子ではそれぞれ381nm、398nmえられ、多少の凝集があるものの、再分散性が高い微粒子がえられたことがわかった。さらに、図6及び図7に示すように、3%BSA含有PBS中でのAS006あるいはBDPの放出挙動を測定した結果、凍結乾燥処理の有無に関わらず同様の放出挙動をとっており、凍結乾燥による徐放への影響がないことが明らかになった。

【0027】(実施例6) 10%プロテオースペプトンを1.5ml腹腔内投与して刺激したマウスの腹腔からマクロファージを採取し、100,000cells/48wellで播種しRPMI1640培地(FBS10%含む)により数日培養した。培地交換後、実施例1に従い調製した蛍光色素のローダミンを薬物モデルとして封入したPLGA微粒子を添加し、1時間半37°Cでインキュベートした。PBSで3回洗浄し、所定時間後細胞を4%中性ホルマリン溶液で固定し蛍光顕微鏡(IX-70、オリンパス)により細胞を観察した。結果は図8に示したように、ローダミンのみを添加した場合に比べ微粒子に封入することで顕著にマクロファージに取り込まれることがわかった。また、微粒子の取り込み後、培地交換を行い37°Cでインキュベートした結果、1週間後においても細胞内に相当量のローダミンが残存し続けていることが明らかになった。また、PLGA微粒子の代わりにPLA微粒子を用いて同様の検討を行い、同様の結果が得られた。

【0028】(実施例7) 6mg/mlの乾燥M. Butyricum含有アジュバンド懸濁液100μlをラットの尾根部に注射し、6日後左足の足底に1%カラゲニン含有生理食塩水を100μl投与することで持続性関節炎モデルラットとした(Y. Mizushima et. al., J. Pharm. Pharmac., 1972, 24, 781-785)。カラゲニン投与24時間後、実施例2にて調製したBDP含有PLGA製剤(ベタメサゾンとして50μg/ラット)を尾静脈より投与し、足の腫れをボリュームメーターにて経時的に測定した。対照として、PBSのみを尾静脈投与したラットと同力価のリン酸ベタメサゾンを皮下投与したラットを用いた。結果は図9に示したように、リン酸ベタメサゾンを投与した時には1日目に強く腫れを抑制していたが、その後急激に抑制効果が弱くなった。一方BD

P含有PLGA製剤では、1日目はリン酸ベタメサゾンと同程度の抑制効果を示し、その後数日間にわたり強く腫れを抑制できることが明らかになった。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1に従い調製したPLGA微粒子への様々な薬物の封入率を示す図である。

【図2】実施例2に従い調製したAS006封入PLGA微粒子からのAS006の放出挙動を示す図である。

【図3】実施例2に従い調製したBDP封入PLGA微粒子からのBDPの放出挙動を示す図である。

【図4】実施例1に従い調製した各薬物封入PLGA微粒子を1%SDS水溶液あるいは80%FBS中に37°Cで5分間懸濁放置した後の薬物のPLGA微粒子への残存率を示した図である。

【図5】実施例2に従い調製したPLGA微粒子を各安定剤 *

*存在下で凍結乾燥後、水にて再懸濁した時のPLGA微粒子の濁度を示した図である。

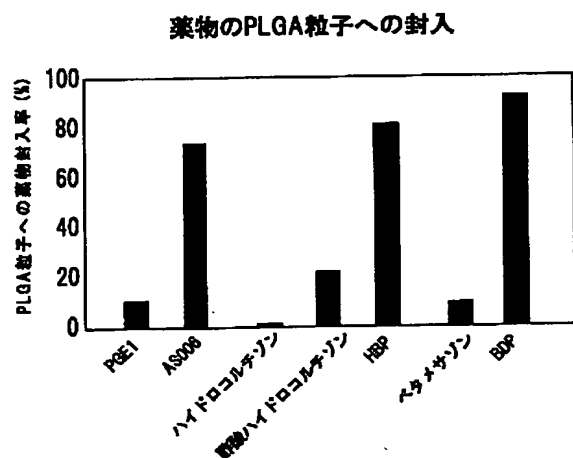
【図6】実施例4に従い調製した表層のAS006を除去したPLGA微粒子を、10%スクロース中で凍結乾燥し3%BSA含有PBS中で再懸濁した時のAS006の放出挙動を示した図である。

【図7】実施例2に従い調製したBDP封入PLGA微粒子を、10%スクロース中で凍結乾燥し3%BSA含有PBS中で再懸濁した時のBDPの放出挙動を示した図である。

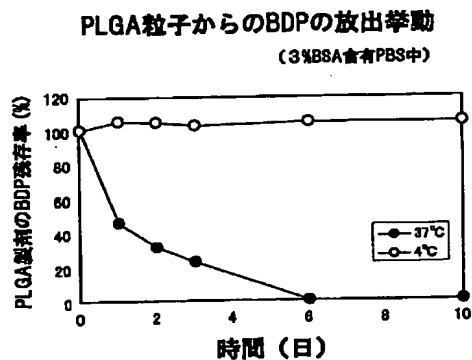
10 【図8】実施例1に従い調製したローダミン封入PLGA微粒子のマクロファージ細胞の取り込みとその取り込まれたローダミンの細胞残留性を経時的に蛍光顕微鏡で観察した図である。

【図9】実施例2に従い調製したBDP含有PLGA微粒子の関節炎モデルラットへの炎症抑制効果を示した図である。

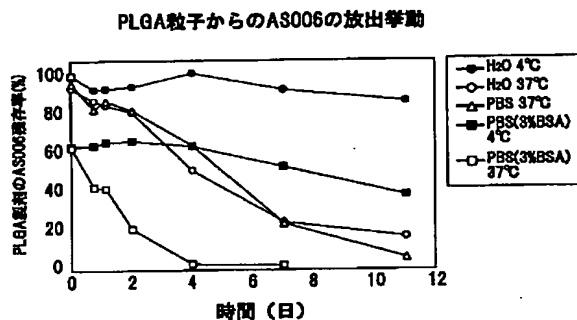
【図1】



【図3】

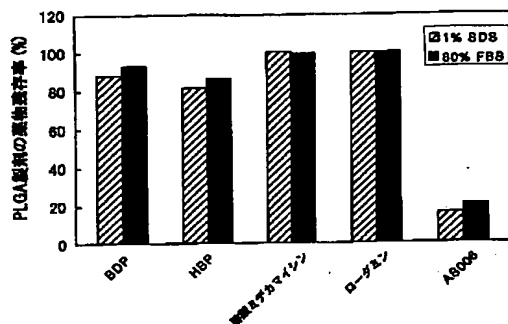


【図2】



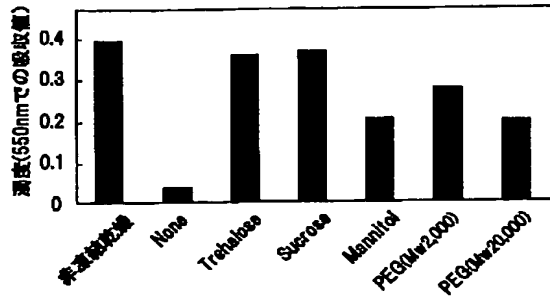
【図4】

SDS及びFBS(ウシ胎児血清)中でのPLGA製剤の薬物残存率



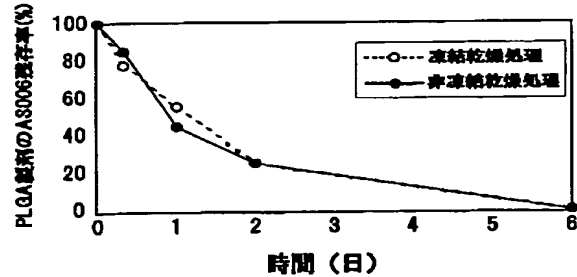
【図5】

凍結乾燥処理したPLGA粒子の再分散性及び安定化剤の効果
(PLGA粒子の濁度を測定)



【図6】

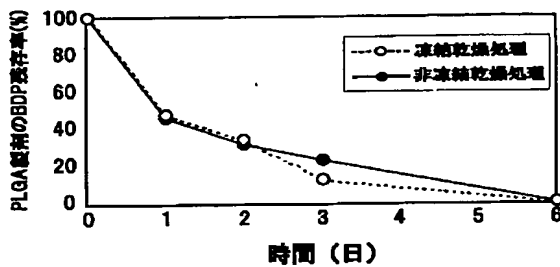
凍結乾燥処理したPLGA粒子からのAS006放出挙動



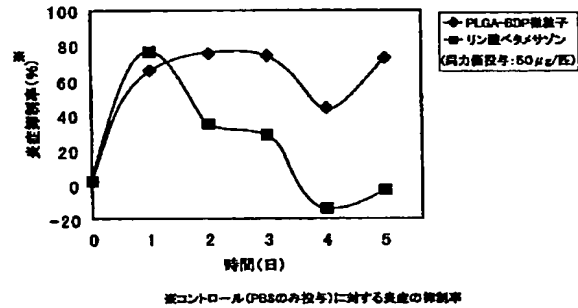
【図9】

【図7】

凍結乾燥処理したPLGA粒子からのBDP放出挙動

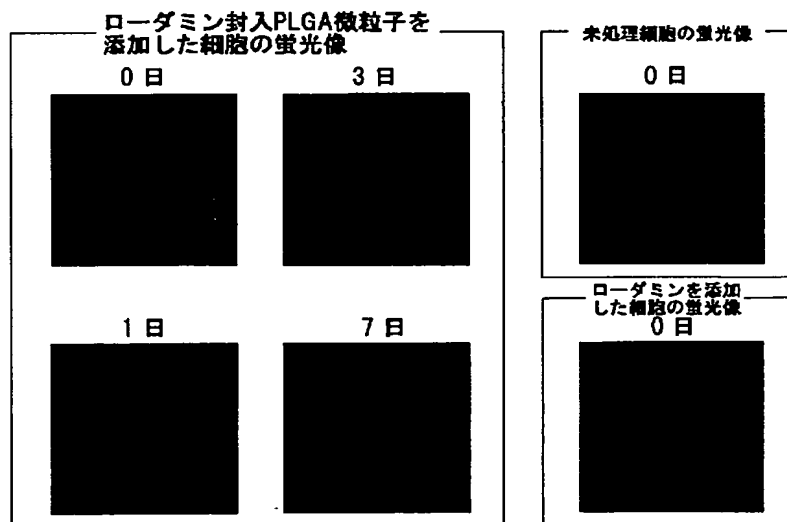


BDP封入PLGA微粒子によるACIモデルラットにおける炎症抑制効果



【図8】

マクロファージへのローダミン封入PLGA微粒子の取り込みとその徐放



※ 明部は細胞内のローダミンに由来する
※ 日数は、取り込み処理後培地交換してからの経過日数である

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターム(参考)
A 6 1 K	47/26	A 6 1 K	47/26
A 6 1 P	9/14	A 6 1 P	9/14
	43/00		43/00
	1 2 3		1 2 3

F ターム(参考) 4C076 AA31 AA94 AA95 BB13 CC04
CC11 DD63H EE24A EE48A
GG04
4C086 DA03 DA11 MA01 MA05 MA43
MA66 NA12 NA13 NA15 ZA44
ZB11

THIS PAGE BLANK (USPTO)